

На правах рукописи

Одношивкина Юлия Геннадьевна

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ
ФУНКЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ МЫШИ ПРИ
АКТИВАЦИИ БЕТА-2- АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ**

03.03.01 - физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань-2013

Работа выполнена в ГБОУ ВПО «Казанский государственный
медицинский университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАМН
Зефиров Андрей Львович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Аникина Татьяна Андреевна

доктор медицинских наук, профессор
Пятин Василий Федорович

Ведущая организация — Учреждение Российской академии
медицинских наук НИИ нормальной физиологии им. П. К. Анохина
РАМН

Защита состоится «19» февраля 2013 г. в « » часов на
заседании Диссертационного совета Д 212.081.28 при ФГАОУ ВПО
«Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу:
420008, г. Казань, ул. Левобулачная, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке
им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул.
Кремлевская, д. 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном
сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный
университет» www.ksu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2013 г

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.м.н., профессор



Зефиров Т.Л.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Исследование регуляции сократимости миокарда является актуальным направлением в физиологии сердца. Один из основных механизмов, контролирующих сердечную деятельность, связан с воздействием катехоламинов (адреналина и норадреналина) на β -адренорецепторы кардиомиоцитов [Д.В. Абрамочкин, Г.С. Сухова, Л.В. Розенштраух, 2006; Кошелев В.Б., 2010; Buxton B.F., et al., 1987]. На основании структурных особенностей и разной чувствительности к фармакологическим агентам адренорецепторы разделяют на α_1 , α_2 , и β_1 , β_2 , β_3 подтипы. В сердце человека доминируют β_1 и β_2 подтипы, а их соотношение в предсердиях и желудочках составляет 70:30 % и 80:20 %, соответственно [Buxton B.F. et al., 1987].

Молекулярные исследования β_2 -адренорецепторов обнаружили их крайне интересные свойства. Активация β_2 -адренорецепторов кардиомиоцитов снижает негативные эффекты гипоксии, воспаления и активных форм кислорода [McGraw D.W., Liggett S.B., 2005]. Было показано существование нескольких активных состояний (конформаций) β_2 -адренорецептора, в которых рецептор с разной эффективностью связывается с сигнальными молекулами и, следовательно, способен запускать различные варианты клеточных ответов [Bokoch M. P., et al., 2010; Jozwiak K., et al., 2010; Rosenbaum D. M., et al., 2011]. При этом разные агонисты переводят β_2 -адренорецепторы в специфичные активные конформации, поэтому от типа агониста зависит клеточный ответ (этот феномен называют «функциональной селективностью» агонистов). Также в зависимости от дозы агониста β_2 -адренорецепторы могут «нанимать» для передачи сигнала внутрь клетки различные сигнальные каскады и/или с разной эффективностью связываться с эффекторными молекулами [Sun Y., et al., 2007]. Как и все адренорецепторы, β_2 -подтип принадлежит к суперсемейству сопряженных с G-белками рецепторов. При этом β_2 -адренорецепторы взаимодействуют с разными G-протеинами: Gs-белком, стимулирующим каскад аденилатциклаза – цАМФ – протеинкиназа A, и Gi-белком, который угнетает аденилатциклазу и активирует путь фосфоинозитол-3-киназа – протеинкиназа B [Swift S.M. et al., 2007; Liu R. Et al., 2009].

Механизмы действия β_2 -адренорецепторов малоизучены и затрагивают, по разным данным, систему аденилатциклазы, потенциал-зависимые Ca-каналы L-типа, рианодиновые рецепторы и другие сигнальные молекулы [Cherezov V. et al., 2007; Haase H., 2007; Zhou P.

et al., 2009]. Таким образом, β_2 -адренергическая регуляция сердца остается недостаточно изученной, и ее детальное исследование может внести существенный вклад в разработку новых кардиопротекторных и кардиомодулирующих препаратов.

Цель и задачи исследования:

Целью исследования являлось выявление эффектов и механизмов действия агониста β_2 -адренорецепторов (фенотерола) на сократимость, Ca^{2+} -сигналы и продукцию оксида азота в изолированных предсердиях мыши.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать вклад β_2 -адренорецепторов в реакцию предсердий на норадреналин.
2. Определить эффект разных доз агониста (фенотерола) на силу сокращения изолированных предсердий мыши.
3. Выявить влияние низких (5 мкМ) и высоких (50 мкМ) доз фенотерола на динамику Ca^{2+} -сигналов и продукции оксида азота.
4. Выявить роль аденилатциклазы и протеинкиназы А в эффектах активации β_2 -адренорецепторов.
5. Выявить роль NO-синтазы в эффектах активации β_2 -адренорецепторов.
6. Определить влияние длительности активации β_2 -адренорецепторов на силу сокращения изолированных предсердий мыши.
7. Исследовать изменение сократимости, Ca^{2+} -сигналов и продукции оксида азота при кратковременной активации β_2 -адренорецепторов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Активация β_2 -адренорецепторов селективным агонистом (фенотеролом) увеличивает силу сокращения предсердий. Динамика положительной инотропной реакции определяется концентрацией и длительностью аппликации агониста.
2. Механизм эффектов активации β_2 -адренорецепторов связан с изменением активности двух каскадов (аденилатциклазный и NO-синтазный), разнонаправлено регулирующих силу сокращения.

Научная новизна

В работе впервые произведен подробный анализ влияния разных доз агониста и отличающихся по длительности аппликаций на функционирование предсердий. Был выявлен медленно-

развивающийся (через 15-20 мин после аппликации) положительный инотропный эффект агониста β_2 -адренорецепторов фенотерола, в концентрации 5 мкМ. Тогда как фенотерол в высокой концентрации (50 мкМ) вызывал быструю положительную инотропную реакцию предсердий. При этом оба эффекта исчезали на фоне селективного ингибирования β_2 -адренорецепторов и зависели от увеличения внутриклеточного систолического уровня Ca^{2+} и изменения продукции оксида азота. В ходе выполнения исследования была предложена и подтверждена гипотеза о том, что фенотерол запускает внутриклеточные сигнальные каскады (аденилатциклаза - протеинкиназа А - Ca -каналы L-типа и NO-синтаза), которые определяют специфику разносторонней регуляции силы сокращения. Также нами были получены приоритетные данные об увеличении амплитуды сокращений предсердий, проявляющемся только после завершения кратковременной фармакологической стимуляции β_2 -адренорецепторов. Этот эффект сопровождался увеличением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} и снижением продукции оксида азота.

Научно-практическая ценность

Полученные данные имеют теоретический характер, дополняя современные представления о механизмах регуляции деятельности сердца, и имеют прикладные аспекты, связанные с обоснованием применения агонистов β_2 -адренорецепторов при лечении сердечной недостаточности и с разработкой методов помпового (периодического) введения β_2 -адреномиметиков, при которых агонист действует кратковременно. То есть имеют практическое значение при разработке средств фармакологической коррекции сердечной деятельности. Результаты исследования представляют практическую ценность для физиологов, биофизиков, биохимиков, фармакологов и нейрехимиков. Полученные данные используются при чтении лекций на кафедре нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 12-04-31032-мол-а, 11-04-00422-а).

Личный вклад диссертанта

Приведенные в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах работы, включая составление плана исследования, проведение экспериментов, обработку полученных данных и оформление публикаций.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы доложены на следующих конференциях и съездах: на XV, XVI, и XVII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2010, 2011, 2012); международном симпозиуме «Biological Motility: from Fundamental Achievements to Nanotechnologies» (Пушино, 2010), XXI съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010); XVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносова» (Москва, 2011); второй конференции молодых ученых и студентов "Экспериментальная и прикладная физиология" (Москва, 2011), V всероссийской с международным участием школьно-конференции «Физиология кровообращения» (Москва, 2012), на заседании ФО им. И.П. Павлова (Казань, 2012), на заседании кафедры нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета (2012).

Реализация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 3 публикации в рецензируемых журналах (из списка ВАК). Материалы диссертации неоднократно доложены на ежегодных научных конференциях в Казанском государственном медицинском университете. Полученные данные используются при чтении лекций на кафедре нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация объемом 120 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка литературы. Список цитируемой литературы включает 256 источников, из них 11 - отечественных и 245 - иностранных авторов. Диссертация содержит 20 рисунков и 1 таблицу.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на препаратах изолированных предсердий белых мышей. Все эксперименты выполнены при постоянной наружной перфузии препарата раствором Кребса для теплокровных животных следующего состава (мМоль/л): NaCl — .144,0; KCl — 5,0; MgCl₂ – 1,0; CaCl₂ – 2,0; NaH₂PO₄ — 1,0; NaHCO₃

—2,4; $C_6H_{12}O_6$ — 11,0. Все эксперименты проведены при температуре 20°C, pH поддерживался на постоянном уровне 7.2-7.4.

В экспериментах применяли следующие фармакологические препараты: (\pm)-фенотерол - селективный агонист β_2 – адренорецепторов, в концентрациях 1-300 мкМ; ICI-118.551- селективный блокатор β_2 – адренорецепторов, в концентрации 0,1 мкМ; Rp-Adenosine 3',5'-cyclic monophosphorothioatetriethyl ammonium salt hydrate (Rp-cAMPS) - блокатор протеинкиназы A, в концентрациях 5 и 20 мкМ; ω -Nitro-L-arginine methylesterhydrochloride (L-NAME) -блокатор NO-синтазы, в концентрации 100 мкМ; cisN-(2-phenylcyclopentyl) azacyclotridecl-enamine hydrochloride (MDL-12330A) -ингибитор аденилатциклазы, в концентрациях 3-20 мкМ; Все использованные вещества фирмы «SIGMA» (США).

Тензометрия. Сократительную активность миокарда в эксперименте *in vitro* у мыши изучали на изолированных предсердиях. Эксперименты по определению сократимости миокарда проводились на установке PowerLab (AD Instruments, Австралия), датчиком силы MLT 050/D (AD Instruments, Австралия). Препарат помещали вертикально в резервуар объемом 20 мл, рабочий раствор при комнатной температуре. Верхний конец препарата прикреплялся к датчику напряжения через металлическую планку, нижний конец к фиксирующему блоку. Препарат стимулировался электрическим стимулом через 2 платиновых электрода (с помощью стимулятора ЭСЛ-2 (Россия) с частотой стимулов 0,1 Гц амплитудой сигнала 40 мВ, продолжительность стимула 5 мс. Запись кривой регистрировали на персональном компьютере при помощи программного обеспечения "Chart 5.3". Сигналы обрабатывали с помощью программы Chart или Elf (автор А.В.Захаров), силу сокращения определяли в граммах. Оценивали силу сокращения. Статистический анализ проводили с помощью стандартных методов, достоверность различий определяли с помощью параметрического t-критерия Стьюдента (Лакин, 1984).

Флуоресцентная микроскопия. Флуоресценцию наблюдали с помощью микроскопов OLYMPUS cX41 (со сменными монохроматическими источниками возбуждающего света) и OLYMPUS BX51 (оснащенного конфокальной системой DSu) с использованием объективов LMPlanFI 20 \times /0.40 и uPlanSApo 60 \times /1.20W. Изображения регистрировали быстродействующими CCD-видеокамерами фирмы OLYMPUS, черно-белой F-View II и цветной DP71. Для обработки изображений применяли программы Cell[^]A, cell[^]P и ImagePro. Интенсивность свечения оценивали в относительных единицах (отн.ед.), соответствующих значению яркости в пикселях.

Измерение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} .

Изменения концентрации Ca^{2+} определяли с помощью красителя Fluo-4, который позволяет точно измерять концентрации Ca^{2+} в диапазоне от 1 мкМ до 1 мМ. Fluo-4 слабо флуоресцирует в отсутствие Ca^{2+} , однако при связывании с ионами Ca^{2+} флуоресценция Fluo-4 увеличивается более чем в 100 раз [Harkins A.B., et al., 1993]. Препарат изолированного предсердия выдерживали в растворе, содержащем 1 мкМ Fluo-4-AM, в течение 20 мин при комнатной температуре, и перфузировали физиологическим раствором, не содержащим краситель, в течение 30 мин. Далее регистрировали флуоресценцию в пучке кардиомиоцитов. Флуоресценцию красителя возбуждали короткими (около 1 с) вспышками света с длиной волны 480 нм, а свечение регистрировали с использованием эмиссионного светофильтра, пропускающего свет с длиной волны более 515 нм. В ходе циклов сокращения–расслабления препарата наблюдались периодические изменения свечения Ca^{2+} -сensors в виде вспышек (« Ca^{2+} - сигналов»). Для оценки амплитуды Ca^{2+} - сигналов из значения максимальной флуоресценции (в период систолы) вычитали минимальную величину флуоресценции в период диастолы.

Измерение концентрации оксида азота (NO). Продукцию оксида азота детектировали при помощи маркера DAF-FM-диацетата (Molecular Probes, США), который возбуждали светом длиной волны $\lambda = 495$ нм, а при регистрации флуоресценции применяли эмиссионный фильтр, пропускающий свет с длиной волны более 515 нм. DAF-FM практически не флуоресцирует до вступления в реакцию с NO, но при взаимодействии с NO его флуоресценция возрастает более чем в 160 раз [Woo A.Y., et al., 2009]. DAF-FM растворяли в DMSO и хранили в замороженном виде в защищенном от света месте. Препарат изолированного предсердия выдерживали в растворе с 2 мкМ DAF-FM-диацетатом в течение 30 мин. Далее препарат перфузировали физиологическим раствором, не содержащим краситель, в течение 20 мин (время, за которое заканчивается реакция деацетилирования маркера) [Kojima H., et al., 1999], после чего регистрировали флуоресценцию в пучке кардиомиоцитов. Статистический анализ проводили при помощи программы OriginPro. Результаты измерений представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (n – число независимых опытов). Достоверность различий определяли с помощью критериев Стьюдента и ANOVA.

Эксперименты выполнены совместно с А.М. Петровым (доц. каф. норм. физиологии КГМУ, к.б.н.)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование вклада β_2 -адренорецепторов в реакцию предсердий на норадреналин. Добавление 10 мкМ норадреналина на три минуты приводило к увеличению силы сокращения изолированного предсердия мыши до 182 ± 5 % ($n=6$, $p<0.05$), после смены раствора на физиологический амплитуда сокращений сохранялась на повышенном уровне: к 15 минуте достигала 178 ± 6 % ($n=6$, $p<0.05$). На фоне селективного блокатора β_2 - адренорецепторов (0.1 мкМ ICI-118.551) под влиянием норадреналина сила сокращений возрастала в меньшей степени и составила 170 ± 5 % ($n=6$, $p<0.05$) к 5 минуте эксперимента, а после смены раствора амплитуда сокращений снизилась до 100 ± 7 % ($n=6$, $p<0.05$) к 10 минуте и до 80 ± 7 % ($n=6$, $p<0.05$) к 20 минуте (рис. 1 А). Аппликация 10 мкМ норадреналина в течение 20 минут также вызывает положительную инотропную реакцию предсердий, сила сокращений достигает 200 ± 7 % ($n=6$, $p<0.05$) и сохраняется на этом уровне при смене раствора на физиологический. На фоне же селективного блокатора β_2 - адренорецепторов (0.1 мкМ ICI-118.551) положительная инотропная реакция предсердий значительно снижается и достигает 150 ± 6 % ($n=6$, $p<0.05$) к 10 минуте эксперимента, а после смены раствора на физиологический амплитуда сокращений снижается до 70 ± 5 % к 40 минуте ($n=6$, $p<0.05$) (рис. 1 Б). Таким образом, увеличение силы сокращений предсердий при действии норадреналина (10 мкМ) частично определяется активацией β_2 -адренорецепторов.

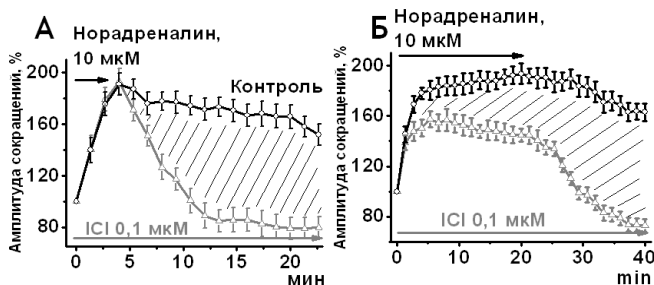


Рис. 1. Влияние норадреналина на силу сокращения изолированных предсердий.

На рисунке показана амплитуда сокращений предсердий под действием норадреналина, в контроле (кружки) 3 мин (А), 20 мин (Б) и на фоне селективного блокатора β_2 -адренорецепторов (0.1 мкМ ICI-118.551) (треугольники) (А, Б). Аппликация норадреналина и ICI-118.551 обозначены стрелками. Вклад β_2 -адренорецепторов в положительную инотропную реакцию предсердий на норадреналин показан штриховкой.

Влияние агониста β_2 - адренорецепторов – фенотерола на сократимость изолированных предсердий мыши. Добавление фенотерола в концентрации от 1 до 300 мкМ вызывало существенное увеличение силы сокращения (рис. 2 А, Б). Аппликация 1 и 5 мкМ фенотерола повышала силу сокращений до $134 \pm 4 \%$ ($n=5$, $p<0.01$) и $145 \pm 5 \%$ ($n=5$, $p<0.01$) относительно контрольного значения соответственно. Под действием фенотерола (25 и 50 мкМ) сила сокращений еще более возрастала – до $160 \pm 5 \%$ ($n=6$, $p<0.01$) и $176 \pm 6 \%$ ($n=8$, $p<0.01$). Однако в концентрации 300 мкМ фенотерол повышал амплитуду сокращений только до $143 \pm 6 \%$ ($n=5$, $p<0.01$) (рис. 2 В). На фоне селективного блокатора β_2 -адренорецепторов (0.1 мкМ ICI - 118.551) положительный инотропный эффект фенотерола в концентрации 5 и 50 мкМ не проявлялся (данные не приведены).

Результаты экспериментов указывают на то, что скорость проявления положительного инотропного эффекта фенотерола изменяется в зависимости от его концентрации: чем выше концентрация, тем раньше наблюдается увеличение силы сокращений, и тем оно более выражено (рис. 2 А, Б). Интересно отметить, что активация β_2 -адренорецепторов низкими концентрациями селективного агониста фенотерола вызывает медленно развивающуюся положительную инотропную реакцию, регистрируемую через 20–25 мин. В дальнейшем использовались две концентрации фенотерола: 5 мкМ, при которой наблюдался медленно развивающийся эффект, и 50 мкМ, при которой сила сокращений быстро увеличивалась (рис. 2 В).

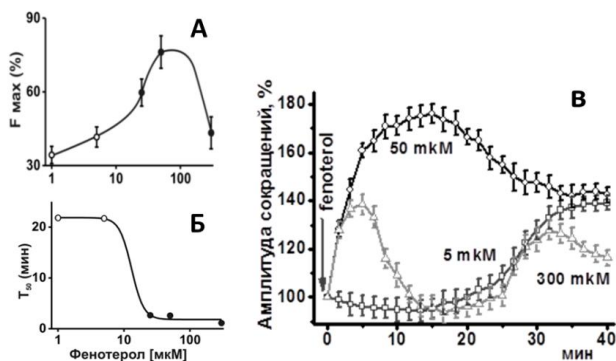


Рис. 2. Влияние фенотерола на силу сокращения изолированных предсердий.

А – максимальная амплитуда сокращений (F max); Б – время от начала аппликации фенотерола до момента, когда амплитуда сокращения достигала 50% от максимальной (T50). В – Изменение силы сокращения предсердий под действием 5, 50 и 300 мкМ фенотерола (кружки, квадраты и треугольники соответственно)

Влияние агониста β_2 - адренорецепторов – фенотерола на Ca^{2+} -сигналы и продукцию оксида азота. Динамика изменений внутриклеточной концентрации ионов кальция, запускающих сокращения кардиомиоцитов, существенно меняется под воздействием фенотерола (рис. 3 А). Низкая концентрация фенотерола (5 мкМ) ведет к постепенному увеличению амплитуды Ca^{2+} -сигналов. К 10 мин аппликации β_2 - агониста амплитуда Ca^{2+} - сигналов достигала 152 ± 5 % ($n=7$, $p<0.01$) от исходных значений. После 15 мин аппликации агониста амплитуда Ca^{2+} -сигналов несколько снижалась, а через 20 мин стабилизировалась на повышенном уровне – около 130–140 %. Через 5 мин после замены наружного раствора раствором без фенотерола величина Ca^{2+} - сигналов составляла 134 ± 4 % ($n=7$, $p<0.01$). Амплитуда Ca^{2+} - сигналов возвращалась к исходному уровню примерно через 60–70 мин. Аппликация фенотерола в высокой концентрации (50 мкМ) вызывала повышение амплитуды Ca^{2+} -сигналов до 122 ± 5 % ($n=7$, $p<0.05$) уже через 30 с, а к 3 мин амплитуда достигала максимального значения – 155 ± 5 % ($n=7$, $p<0.01$). Через 8 мин аппликации величина Ca^{2+} - сигналов начинала снижаться, и к 20 мин от начала действия фенотерола составляла 111 ± 4 % ($n=7$, $p<0.05$). Восстановление исходной величины Ca^{2+} - сигналов происходило через 50–60 мин после начала перфузии препарата раствором без фенотерола.

Под влиянием фенотерола флуоресценция маркера DAF-FM (показатель продукции NO) в кардиомиоцитах предсердий достоверно возрастала (рис. 3 Б). Фенотерол в низких дозах запускал постепенное увеличение продукции оксида азота, а к 20 мин аппликации фенотерола интенсивность флуоресценции увеличивалась до 104 ± 1 % ($n=6$, $p<0.05$). После удаления фенотерола из наружного раствора флуоресценция быстро снижалась до 95 ± 1 % ($n=6$, $p<0.05$) от исходного уровня и в течение 10 мин возвращалась к исходному уровню. Под действием высокой дозы фенотерола в первые 5 мин аппликации наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции DAF-FM (к 5 мин интенсивность флуоресценции составляла 96 ± 1 %) ($n=6$, $p<0.05$). После 8 мин аппликации фенотерола интенсивность флуоресценции начинала возрастать и достигала 104 ± 1 % ($n=6$, $p<0.05$) через 20 мин. После перфузии препарата раствором, не содержащим фенотерол, интенсивность флуоресценции превышала контрольный уровень в течение 10–15 мин и составляла 104–108 % ($n=6$, $p<0.05$) от исходной величины.

Таким образом, предполагается, что динамика и выраженность положительного инотропного эффекта при фармакологической

стимуляции β_2 -адренорецепторов определяются скоростью увеличения амплитуды Ca^{2+} - сигналов и изменением продукции оксида азота.

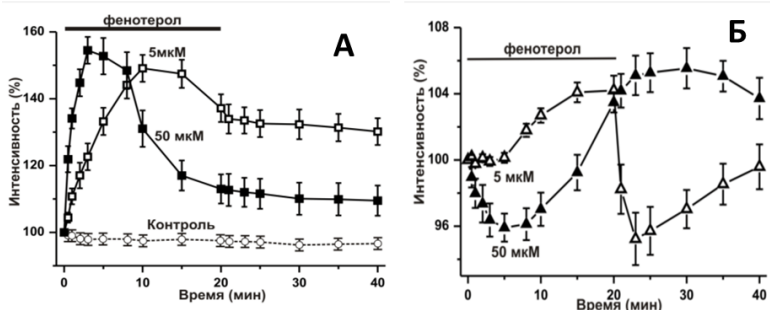


Рис.3. Влияние агониста β_2 - адренорецепторов – фенотерола на Ca^{2+} - сигналы (А) и продукцию оксида азота (Б).

На рисунке показана динамика флуоресценции Ca^{2+} - индикатора Fluo-4и маркера DAF-FM (показателя продукции оксида азота), предварительно загруженных в кардиомиоциты, под воздействие 5 и 50 мкМ фенотерола (светлые и черные квадраты и треугольники, соответственно). Светлыми кружками, соединенными пунктирной линией, показано изменение амплитуды Ca^{2+} - сигналов в отсутствие фенотерола (контроль). Аппликация фенотерола обозначена чертой.

Эффекты блокирования аденилатциклазы и протеинкиназы А на силу сокращений, амплитуду Ca^{2+} - сигналов, изменение продукции оксида азота при активации β_2 – адренорецепторов. Блокирование аденилатциклазы (MDL) достоверно изменяло инотропное действие фенотерола. На фоне MDL в концентрации 20 мкМ фенотерол оказывал слабый отрицательный инотропный эффект – амплитуда сокращений снижалась до 83 ± 2 % ($n=5$, $p<0.05$) (рис.4А). Аналогичным эффектом обладал специфичный ингибитор протеинкиназы А (Rp-cAMPS). В концентрации 20 мкМ он инвертировал действие агониста β_2 – адренорецепторов (амплитуда сокращений уменьшалась до 79 ± 4 % ($n=5$, $p<0.05$) (рис.4А).

При ингибировании аденилатциклазы 10 мкМ MDL амплитуда Ca^{2+} - сигналов снижалась до неопределяемого уровня, что указывает на высокую фоновую активность аденилатциклазной системы, которая стимулирует активность Ca^{2+} - каналов плазматической мембраны и мембраны саркоплазматического ретикулама. На фоне более низких концентраций MDL (3 мкМ) изменения амплитуда Ca^{2+} - сигналов под действием фенотерола были менее выражены (рис.4 Б.). Так, к 3-й и 10-й минутам действия фенотерола амплитуда Ca^{2+} - сигналов возрастала только до 118 ± 3 % ($n=6$, $p<0.05$) и 129 ± 4 % ($p<0.05$)

соответственно. В дальнейшем амплитуда Ca^{2+} - сигналов начинала уменьшаться, составляя к 20-й минуте 122 ± 4 % ($p < 0.05$), а к 40-й минуте величина Ca^{2+} - сигналов достоверно не отличалась от контрольной (рис.4Б).

На фоне ингибитора аденилатциклазы 3 мкМ MDL фенотерол оказывал более существенный эффект на продукцию оксида азота (NO). В этих условиях через 10 и 20 мин действия фенотерола флуоресценция DAF-FM возрастала до 110 ± 1 % ($n=7$, $p < 0.05$) и 122 ± 1 % ($p < 0.05$) соответственно. К 40-й мин свечение DAF-FM составляло 107 ± 1 % ($p < 0.05$) (рис. 4 В).

Представленные данные, свидетельствуют о том, что блокирование внутриклеточного сигнального каскада аденилатциклаза – протеинкиназа А приводит к угнетению положительного инотропного эффекта активации β_2 -адренорецепторов, за счет уменьшения Ca^{2+} - сигналов и увеличения продукции оксида азота.

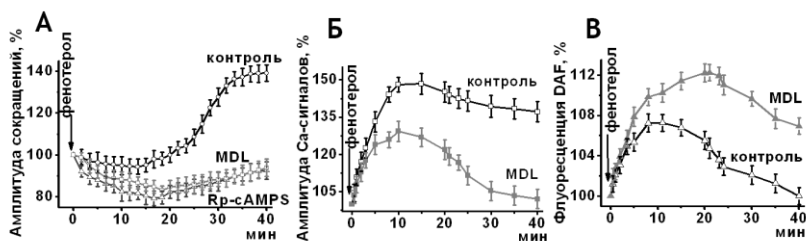


Рис.4. Роль аденилатциклазы и протеинкиназы А в эффектах активации β_2 – адренорецепторов.

А-действие фенотерола (5 мкМ) на динамику амплитуды сокращения предсердий мыши в контроле (светлые кружки), на фоне блокирования аденилатциклазы (20 мкМ MDL, светлые квадраты), протеинкиназы А (20 мкМ Rp-cAMPS, светлые треугольники). Б - влияние фенотерола (5 мкМ) на динамику амплитуды Ca^{2+} - сигналов в контроле (светлые квадраты) и при ингибировании аденилатциклазы (3 мкМ MDL, темные квадраты). В- динамика свечения DAF-FM (показателя уровня оксида азота в кардиомиоцитах) при фармакологической стимуляции β_2 – адренорецепторов в контроле (светлые треугольники) и на фоне ингибирования аденилатциклазы (3 мкМ MDL, темные треугольники). Аппликация фенотерола указана стрелкой.

Эффекты блокирования NO - синтазы на силу сокращений, амплитуду Ca^{2+} - сигналов, изменение продукции оксида азота при активации β_2 – адренорецепторов. Блокирование NO – синтазы с помощью 100 мкМ L-NAME увеличивало амплитуду сокращений предсердий до 114 ± 3 % ($n=6$, $p < 0.05$), что указывает на наличие тонической продукции NO, угнетающей силу сокращения. На фоне L-NAME эффект фенотерола развивался существенно быстрее (рис. 5 А). Уже к 10-й минуте аппликации фенотерола происходило увеличение

амплитуды сокращений до 115 ± 3 % ($n=6$, $p<0.05$), а к 20 - 25-й мин до 130-140 %. Впоследствии амплитуда сокращений медленно снижалась.

На фоне действия L-NAME (100 мкМ) существенно изменялась динамика амплитуды Ca^{2+} - сигналов (рис. 5 Б). Аппликация фенотерола вызывала более значительное увеличение амплитуды Ca^{2+} - сигналов, чем в контроле: спустя 3 мин после добавления фенотерола величина Ca^{2+} - сигналов увеличивалась до 126 ± 2 % ($n=6$, $p<0.05$), а к 20-й мин достигала максимума - 162 ± 4 % ($p<0.01$) (рис. 5 Б). Затем амплитуда Ca^{2+} - сигналов стабилизировалась на повышенном уровне 150-160 %.

В условиях блокирования NO – синтазы (100 мкМ L-NAME) аппликация фенотерола не приводила к увеличению свечения, наоборот, к 15 - 20-й мин флуоресценция маркера DAF-FM уменьшалась до 91-92 % ($n=5$, $p<0.05$) от исходного уровня (до момента добавления агониста). В последующем флуоресценция DAF-FM не изменялась, сохранялась на сниженном уровне (рис 5 В).

Следовательно, блокирование NO – синтазы и продукции оксида азота вызывает ускорение развития положительного инотропного эффекта активации β_2 – адренорецепторов с увеличением амплитуды Ca^{2+} - сигналов.

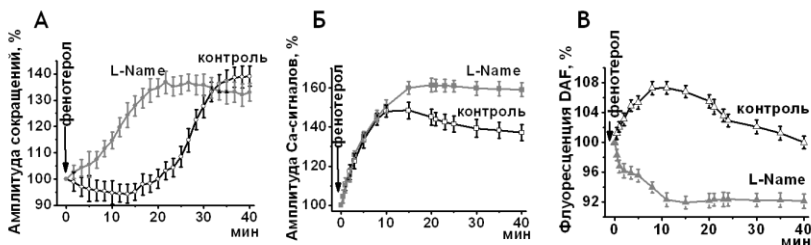


Рис.5. Роль NO - синтазы в реализации эффектов активации β_2 – адренорецепторов.

А - действие фенотерола (5 мкМ) на динамику амплитуды сокращения предсердий мыши в контроле (светлые кружки), на фоне блокирования NO – синтазы (100 мкМ L-NAME, темные кружки). Б - динамика амплитуды Ca^{2+} - сигналов в ответ на аппликацию 5 мкМ фенотерола в контроле (светлые квадраты) и при ингибировании NO – синтазы (100 мкМ L-NAME, темные квадраты). В - изменение свечения маркера DAF-FM (показателя продукции оксида) при активации β_2 – адренорецепторов в контроле (светлые треугольники) и на фоне ингибирования NO – синтазы (100 мкМ L-NAME, темные треугольники). Аппликация фенотерола указана стрелкой.

Зависимость эффектов агониста β_2 – адренорецепторов – фенотерола от длительности его аппликации. Аппликация фенотерола (5 мкМ) приводила к увеличению амплитуды сокращений

предсердий. В течение 1 мин-й аппликации фенотерола достоверных изменений силы сокращения не наблюдалось. Однако после удаления агониста амплитуда возрастала до 116 ± 4 % ($n=7$, $p<0,01$) в течение 10 мин. Если фенотерол добавлялся в раствор на 3 и 10 мин, то положительный инотропный эффект наблюдался также только после удаления фенотерола из раствора. Причем в обоих случаях амплитуда сокращений повышалась до 140-141 %. Интересно отметить, что при 3 мин аппликации эффект достигал указанного значения через 12 мин после «отмывки» фенотерола, а при 10 мин аппликации – через 6 мин. При добавлении же агониста на 20 мин, эффект достигал 145 ± 4 % ($n=6$, $p<0,01$) через 5 мин после аппликации. Длительное 40 мин воздействие фенотерола, вызывает медленно развивающееся увеличение силы сокращения. Оно начинается через 15-20 мин после добавления агониста в наружный раствор: к 25 мин амплитуда сокращений возрастала до 109 ± 4 % ($n=8$, $p<0.05$), а к 40 мин – до 140 ± 4 % ($p < 0.01$) от исходного значения (рис. 6).

Таким образом, время аппликации фенотерола определяло динамику и выраженность положительной инотропной реакции. Для исследования механизмов отставленной инотропной реакции под действием фенотерола мы анализировали кратковременную 1 мин и 3 мин активацию β_2 -адренорецепторов. Положительные инотропные эффекты фенотерола не регистрировались на фоне селективного блокатора β_2 -адренорецепторов 0.1 мкМ ICI-118.551 (рис. 7А).

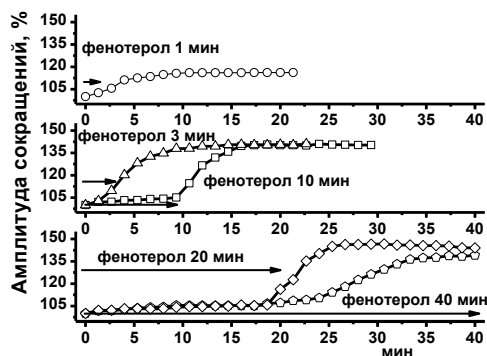


Рис.6. Зависимости силы сокращений предсердий от длительности аппликации агониста β_2 – адренорецепторов – фенотерола.

Динамика изменения амплитуды сокращений предсердий мышцы под действием фенотерола (5 мкМ) при аппликации на 1 мин (кружки), 3 мин (треугольники), 10 мин (квадраты), 20 мин (ромбы), 40 мин (пятиугольники). Длительность аппликации фенотерола указана стрелкой.

Изменение амплитуды Ca^{2+} -сигналов, динамики продукции оксида азота в кардиомиоцитах при кратковременной активации β_2 –адренорецепторов. Активация β_2 - адренорецепторов существенно изменяла уровень систолического цитозольного Ca^{2+} , запускающий сокращения кардиомиоцитов и во многом определяющий их силу (рис. 7 Б). При 1 мин аппликации фенотерола величина Ca^{2+} - сигналов возрастала до $112 \pm 3 \%$ ($n=5$, $p<0.05$) к концу аппликации, на протяжении последующих 4 мин амплитуда сигналов продолжала увеличиваться, достигая $125 \pm 2 \%$ ($n=5$, $p<0.05$), а затем в течение 25-30 мин возвращалась до исходного уровня. В случае 3-х мин аппликации эффект агониста был существенно ярче выражен и длительнее. К 3 мин величина Ca^{2+} - сигналов достигала $140 \pm 3 \%$ ($n=6$, $p<0.05$), а через 13 мин после удаления агониста - $190 \pm 3 \%$ ($n=6$, $p<0.05$). Восстановление исходных значений наблюдалось к 50-60 мин.

На фоне действия фенотерола продукция NO в кардиомиоцитах предсердий возрастала (рис. 7 В). Короткая 1 мин аппликация вела к достоверному увеличению флуоресценции DAF-FM до $102 \pm 0.3 \%$ ($n=6$, $p<0.05$). Однако после завершения аппликации флуоресценция быстро снижалась (через 5 мин до $99 \pm 0.4 \%$) ($n=6$, $p<0.05$). При добавлении фенотерола на 3 мин флуоресценция увеличивалась к 3 мин до $104 \pm 0.4 \%$ ($n=6$, $p<0.05$), а после быстро снижалась: через 5 мин – до $93 \pm 0.7 \%$ ($n=6$, $p<0.05$).

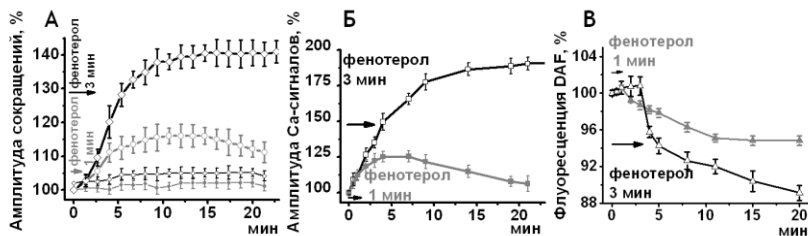


Рис.7. Эффекты кратковременной активации β_2 –адренорецепторов на изменение силы сокращений, амплитуды Ca^{2+} - сигналов, динамики продукции оксида азота в кардиомиоцитах.

А - Динамика силы сокращений при аппликации фенотерола на 1 мин (белые кружки) или 3 мин (белые ромбы). Тонкие кривые показывают влияния 1 мин (темные кружки) и 3 мин (темные ромбы) аппликаций фенотерола на фоне блокирования β_2 - адренорецепторов с помощью 0,1 мкМ ICI-118.551. Б - Изменение амплитуды Ca^{2+} - сигналов при аппликации фенотерола на 1 мин (белые квадраты) или 3 мин (темные квадраты). В - изменение флуоресценции DAF-FM (показатель продукции оксида азота) в предсердии мыши при аппликации фенотерола на 1 мин (белые треугольники) или 3 мин (темные треугольники). Стрелками отмечены 1 мин и 3 мин аппликации фенотерола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предполагаемый механизм влияния активации β_2 -адренорецепторов на медленно развивающуюся положительную реакцию предсердий мыши.

β_2 -адренорецепторы, Ca^{2+} -каналы L-типа, а также сигнальные молекулы, аденилатциклаза и эндотелиальная NO-синтаза, избирательно локализируются в углублениях мембраны, обогащенных холестерином [Pike et al., 2006; Петров А.М. и др., 2013]. Агонист стимулирует β_2 -адренорецепторы, которые усиливают работу аденилатциклазы и эндотелиальной NO-синтазы. Аденилатциклаза синтезирует продукцию молекул вторичного посредника цАМФ, которые активируют протеинкиназу А. (рис. 8). Протеинкиназа А, действуя на Ca^{2+} -каналы L-типа, увеличивает поступление Ca^{2+} в цитоплазму клетки из внеклеточной среды. Помимо этого, протеинкиназа А может влиять на Ca^{2+} -освобождающие каналы саркоплазматического ретикулума, облегчая выход Ca^{2+} из внутриклеточного депо. Повышение внутриклеточного уровня Ca^{2+} ведет к увеличению силы сокращений. Активация эндотелиальной NO-синтазы приводит к увеличению продукции оксида азота, который ограничивает работу Ca^{2+} -каналов L-типа и угнетает силу сокращения. Таким образом, при активации β_2 -адренорецепторов запускаются каскады, разнонаправленно регулирующие силу сокращения, которые в течение первых минут действия агониста уравнивают друг друга (левая панель), впоследствии продукция NO снижается и аденилатциклазный путь увеличивает амплитуду сокращений (правая панель). Предположили, что мишенями действия являются Са-каналы и риадиновые рецепторы.

В предсердиях β_2 -адренорецепторы частично опосредуют положительную инотропную реакцию вызванную норадреналином. Активация β_2 -адренорецепторов селективным агонистом (фенотеролом) также увеличивает силу сокращения предсердий. Причем динамика положительной инотропной реакции определяется концентрацией и длительностью аппликации агониста. Механизм эффектов активации β_2 – адренорецепторов связан с изменением активности двух каскадов (аденилатциклазный и NO-синтазный), разнонаправленно регулирующих силу сокращения.

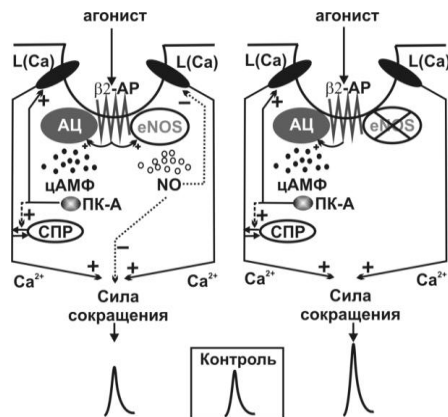


Рис.8. Предполагаемый механизм влияния активации β_2 -адренорецепторов на медленно развивающуюся положительную реакцию предсердий мышцы.

На схеме обозначены: β_2 -адренорецепторы (β_2 -AP), Ca^{2+} -каналы L-типа (L(Ca)), аденилатциклаза (АЦ), эндотелиальная NO-синтаза (eNOS), протеинкиназа А (ПК-А), саркоплазматический ретикулум (СПР), оксид азота (NO).

ВЫВОДЫ

1. Увеличение силы сокращений предсердий при действии норадреналина (10мкМ) частично определяется активацией β_2 - адренорецепторов.
2. Положительный инотропный эффект селективного агониста β_2 – адренорецепторов изменяется в зависимости от его концентрации: чем выше концентрация фенотерола, тем раньше наблюдается увеличение силы сокращений, и тем более оно выражено.
3. Фармакологическая стимуляция β_2 -адренорецепторов вызывает увеличение амплитуды Ca^{2+} - сигналов и изменяет продукцию оксида азота.
4. Блокирование внутриклеточного сигнального каскада аденилатциклаза – протеинкиназа А приводит к угнетению положительного инотропного эффекта активации β_2 – адренорецепторов, за счет уменьшения Ca^{2+} -сигналов и увеличения продукции оксида азота.
5. Блокирование NO – синтазы и продукции оксида азота вызывает ускорение развития положительного инотропного эффекта активации β_2 – адренорецепторов, что сопоставимо с увеличением амплитуды Ca^{2+} - сигналов.

6. Время аппликации фенотерола определяет динамику и выраженность положительной инотропной реакции.
7. При относительно кратковременной (минуты) стимуляции β_2 -адренорецепторов возникает отставленный (наблюдающийся после удаления агониста из окружающей среды) инотропный эффект. После удаления агониста происходит снижение продукции оксида азота при сохранении повышенной амплитуды Ca^{2+} -сигналов.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. **Одношивкина Ю. Г.**, Петров А. М., Зефирова А. Л. Влияние активации β_2 -адренорецепторов в предсердиях мыши на силу сокращения, Ca-сигналы и продукцию оксида азота // Acta Naturae.- 2011.-Т.3, № 1.- С. 85-94
2. **Odnoshivkina Yu.G.**, Petrov A.M., Zefirov A.L. The effects of β_2 -adrenoreceptor activation on the contractility, Ca-signals and nitric oxide production in the mouse atria // Acta Naturae.-2011,- V.3, №2.- P.103-112
3. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А.М., Зефирова А.Л. Механизм опосредуемой β_2 -адренорецепторами медленно развивающейся положительной инотропной реакции предсердий мыши // Российский физиологический журнал им. Сеченова. 2011. -Т. 97, № 11.- С.1223-1236
4. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А.М., Зефирова А.Л. Механизмы отставленной инотропной реакции предсердий мыши на активацию β_2 -адренорецепторов// Доклады Академии Наук.- 2012.- Т. 446, № 6.- С.1-3
5. **Odnoshivkina U.G.**, Petrov A.M., Zefirov A.L. Mechanisms of delayed inotropic response of mouse atria to activation of β_2 -adrenoreceptors// Doklady Biological Sciences. 2012.-V. 446, N. 6, P. 700–702
6. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А. М. Реализация эффектов β_2 -агониста на инотропную функцию изолированных предсердий мыши // XV Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине». Казань.- 2010.- С. 290
7. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А. М. Механизм функционирования β_2 -адренорецепторов в сердце // XVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносова». Москва -2010.-С.275.
8. **Odnoshivkina U.G.**, Zemskova S.N., Petrov A.M. Lipid raft in beta2-adrenoreceptor signaling in mice atrial// Symposium Biological Motility: from fundamental achievements to nanotechnologies. Pushchino. 2010.-P.195-196.

9. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А. М. Аденилатциклаза и NO-синтаза в реализации эффектов агониста β_2 -адренорецепторов // XXI Съезд Физиологического Общества им. И.П. Павлова. Калуга.- 2010.- С. 449
10. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А. М. Роль Са-каналов L-типа в опосредованной β_2 -адренорецепторами регуляции сократимости изолированных предсердий мыши// XVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносова-2011». Москва. -2011.- С.242-243
11. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А. М. Динамика положительной инотропной реакции, кальция и оксида азота при фармакологической активации β_2 -адренорецепторов// XVI Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине». Казань.- 2011.- С. 132
12. Сычев В.И., Пигалева М.С., **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А.М.. Эффекты активации бета2-адренорецепторов в предсердиях мыши на продукцию оксида азота// 85-ая Всероссийская студенческая научная конференция. Казань.- 2011.- С. 354
13. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А. М. Дозозависимые эффекты агониста β_2 -адренорецепторов на сократимость, Са-сигналы и продукцию оксида азота в предсердиях мыши// Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Молодежь - медицине будущего». Одесса.- 2011.- С. 58-59
14. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А. М. «Отставленная» положительная инотропная реакция при активации β_2 -адренорецепторов изолированных предсердий мыши// XV Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Пущино.- 2011.- С. 162-163
15. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А. М. ЦАМФ и NO-зависимый положительный инотропный эффект агониста бета-2-адренорецепторов (фенотерола)// Сборник статей «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Пущино.- 2011.- Т.1, С. 297-301
16. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А.М. Зависимость эффектов агониста бета-2-адренорецепторов фенотерола от длительности его аппликации. // Международная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Молодежь. Наука. Будущее: технологии и проекты». Казань.- 2011.-С.144-147
17. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А.М. Зависимость инотропной реакции предсердий от длительности активации бета-2-адренорецепторов. // Вторая конференция молодых ученых и

студентов "Экспериментальная и прикладная физиология". Москва.- 2011.- С.23-25.

18. **Одношивкина Ю.Г.**, Петров А. М. Инотропный эффект, проявляющийся после аппликации агониста β_2 -адренорецепторов // V Всероссийская с международным участием школа-конференция «Физиология кровообращения». Москва.- 2012.- С. 119-120

Выражаю искреннюю благодарность к.б.н, доценту кафедры нормальной физиологии КГМУ Петрову Алексею Михайловичу за оказанное содействие при выполнении данного исследования .